استخدام الطرق الجزيئية في الكشف عن جينات المقاومة للمضادات في بكتريا التايفوئيد (*Salmonella typhi*)

بتول علي شهاب* ساهرة ياكوت رويح* أشنا جمال فائق**

استلام البحث 20، كانون الاول، 2012
قبول النشر 3، اذار، 2014

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة لغرض الكشف المباشر عن بكتريا *Salmonella typhi* المسببة لحمى التايفوئيد وبعض جيناتها المقاومة للمضادات الحياتية (*tem,catp,gyrA,sul2*)والتي تشفر للمقاومة لكل من(Ampicillin,chloramphicol,ciprofloxacin,co-trimoxazole) على التوالي بتقنية Polymerase Chain Reactionل(71)عينة دم لمرضى يعانون من إعراض المرض مشخصين سريريا و(25)عينة دم لأشخاص أصحاء.أظهرت نتائج التحري عن *flic gene* المشفر لبروتين الفلاجين السوطي لتحديد الإصابة الفعلية ببكتريا السالمونيلا وكان عدد الأشخاص المصابين بالمرض (19) أي بنسبة (26076%)ذا نتيجة موجبة إما عينات السيطرة فكانت النتائج جميعها سلبية. العينات التي أظهرت نتائج موجبة(19) استخدمت للتحري عن جينات المقاومة للمضادات إذ ظهر إن هناك مقاومة متعددة للمضادات بنسبة(94073).

الكلمات المفتاحية: ***Salmonella typhi*, *flic* gene ,multidrugs resistance genes ,PCR**

المقدمة :

أن من أهم المشاكل التي تواجهها منظمات ومؤسسات الصحة في العالم هي حمى التايفوئيد (Typhoid Fever)) ، والتي تعد من ألأمراض المعدية الجهازية (systemic infectious)، التي تصيب الإنسان فقط، تسببها بكتريا السالمونيلا المعوية *Salmonella enterica* من النوع *typhi*(1). ويعد الغذاء والماء الملوث والأشخاص حاملو المرض المصدر الرئيسي للإصابة (2) وقد سجلت منظمات ومؤسسات ومراكز بحوث الصحة في مختلف أنحاء العالم الكثير من التقارير والإحصائيات التي بينت عدد الأشخاص المصابين بهذا المرض. إذ سجل باحثو منظمة الصحة العالمية WHO في التسعينيات 1990 أن 16 مليون شخص يصاب سنويا بهذا المرض.

وكنتيجة لظهور سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) في بكتريا السالمونيلا زادت نسبة الإصابة بالمرض، اذ قدر الباحثون في مركز السيطرة والوقاية من الأمراض في الولايات المتحدة الأمريكية أن هناك 21.6مليون حالة إصابة بحمى التايفوئيد تحصل سنويا، مع تفاوت الإصابة بمقدار 100 - 1000 حالة لكل 100000 شخص. وحوالي 600,000-500,000 حالة وفاة (3) .ولكون سلالات بكتريا *Salmonella* غير قابلة للكشف في العينات السريرية التي تحتوي على عدد قليل من الكائنات الحية فقد أسهمت طرق الكشف بتحديد المستويات القليلة من *enterica.S* في عينات الغذاء بدءا بخطوات ما قبل الاغناء لزيادة أعداد البكتريا ونسبة بكتريا السالمونيلا مقرونة بالكائنات الحية الأُخرى ، ومن ثم يتم عزل الكائنات الحية في أطباق ألأوساط المختارة، وتباعا يتم توصيفها باستخدام الاختبارات الكيموحيوية والمصلية.وبهذه التقنيات التقليدية يتم التعرف على *S.enterica* خلال فترة زمنية تتراوح بين 96-72 ساعة(4).

ومن الطرق السريعة للكشف عن هذه البكتريا هي طريقة ويدال التي تعد من الطرق الرخيصة الثمن وسهلة الاستعمال (5).

إلا أن هذه الطريقة بقيت غير دقيقة في تحديد المرضى المصابين بحمى التايفوئيد خصوصا عند تناول المرضى المسبق للمضادات الحيوية أو أخذهم لِلُقاح .وهناك طرق بديلة استعملت مثل طرق التحليل المناعي (immune analysis) التي طـوِّرَت لتقليل الوقت المطلوب للكشف ، إلا أن هذه الطرق اعتمدت على ضرورة وجود أعداد من البكتريا تتراوح ما بين(100000 – 10000000) خلية/ملي لتر لضمان وثوقية الكشف عن السالمونيلا المعوية (6).

أما التقنيات التي أساسها علم الأحياء الجزيئي والتي بضمنها Polymerase Chain) PCR Reaction) فقد أثبتت فعاليتها بكونها طريقة سريعة ونوعية وحساسة للكشف عن الكائنات المجهرية الحية في النماذج السريرية المُختلفة (7)،لذا هدفت هذة الدراسة الى

- الكشف المباشر عن بكتريا *S.typhi* في عينات من دم مرضى يحملون أعراض حمى التايفوئيد

*كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد
**مختبر الصحة المركزي/وزارة الصحة

باستخدام تقنية PCR اعتمادا على وجود ألجين (*flic* التشخيصي) وكذالك الكشف عن الجينات (*2tem,capt,gyrA,sul*) المقاومة للمضادات الحيوية (Ampicillin ، Chloramphenicol، Ciprofloxacin، Co-trimoxazole) و على التوالي في هذه البكتريا باستخدام تقنية PCR.

المواد وطرائق العمل:

جمعت (71) عينه دم لأشخاص يعانون إعراض حمى التايفوئيد أستاذ إلى التشخيص السريري في مستشفيات بغداد وكذلك (25) عينة دم لأشخاص أصحاء تم اعتمادهم كسيطرة .استخدمت عدد جاهزة لاستخلاص وتنقية ألدنا من شركة (promega)وقد تم اعتماد الاستخلاص على الطريقة المرفقة مع العدة الجاهزة.قيس تركيز ونقاوة الدن ورحل كهربائيا على الهلام حسب ما ذكر في (8) استخدمت في التفاعل خمسة أزواج من البادئات النوعية وفقا لما ذكر في الجدول (1) وبرامج التضخيم وفقا لما ذكر(9) ،استخدم الزوج الأول لاستهداف تتابع نوعي لجين *flic* لتشخيص البكتريا بينما استخدمت البادئات الأخرى لاستهداف تتابعات نوعية لجينات المقاومة (*tem,catp,gyrA,sul2*) وتم تجهيز كل البادئات من شركة Alpha-DNA company بشكل مجفف وبتركيز مختلفة ،استخدم مربع كآي لمعرفة الفروق المعنوية بين مجاميع المرضى والسيطرة

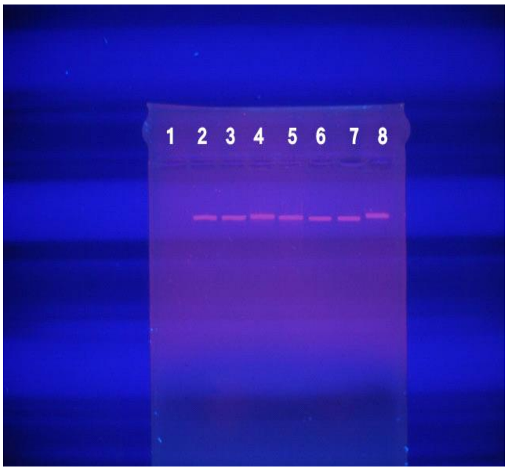
جدول(1) مجموعة البادئات المتخصصة المستخدمة في تفاعلات (PCR)

ألجين الهدف	تتابع البادئ(5'-3')	ناتج التضخيمbps	نوع البادئ
Flic 10	F 5’- ACT GCT AAA ACC ACT ACT 3’ 'TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG 3 -’5 R	363	Detection gene
gyrA 11	F 5'- TAC CGT CAT AGT TAT CCA CGA 3' 'GTA CTT TAC GCC ATG AAC GT 3 -'5 R	313	R Ciprofloxacin
Sul2 12	F 5’- TCA ACA TAA CCT CGG ACA GT 3’ ’GAT GAA GTC AGC TCC ACC T 3 -’5 R	707	R Co-trimoxazole
Tem 12 1	F 5’- GCA CGA GTG GGT TAC ATC GA 3’ ’GGT CCT CCG ATC GTT GTC AG 3 -’5 R	311	R Ampicillin
Catp 13	F 5’- CCT GCC ACT CAT CGC AGT 3’ ’3 CCA CCG TTG ATA TAT CCC-’5 R	623	R Chloramphenicol

R=resist

النتائج والمناقشة:

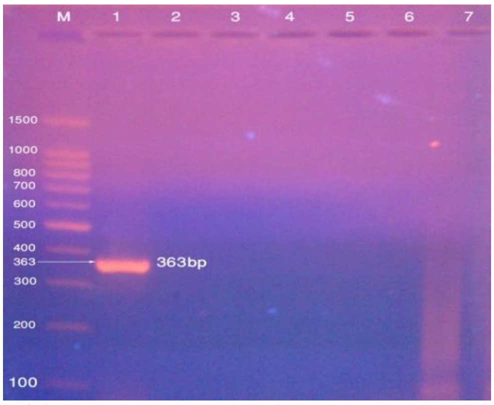
تم عزل ألدنا الكلي المستخلص من عينات الدم للمرضى والسيطرة إذ تم قياس تركيز ألدنا وتقدير نقاوته والتي تراوحت مابين (1.5 – 1.8) وهو من المتطلبات الأساسية لإجراء تفاعلات PCR لغرض تحقيق النتيجة المثلى. الشكل (1) يبين ألدنا الكلي للبكتريا المعزول والمرحل على هلام الاكاروز وصور تحت الأشعة فوق البنفسجية .



الشكل -(1)الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل السلسلي ألدنا الكلي في بكتريا *S.typhi*

أجريت تفاعلات التضخمية لسلسلة ألدنا باستعمال بادئات نوعية تستهدف التسلسل النوعي لجين *flic* والذي يشفر إلى بروتين الفلاجين ألسوطي في بكتريا *S.typhi* وهو جين تشخيصي للإصابة بهذه البكتريا، البادئ صمم حسب ما ورد في طرائق العمل وكذلك البرنامج التفاعلي .

أظهرت النتائج بعد ترحيل ألدنا على هلام الاكاروز 2% ظهور حزم ناتجة عن عملية التضاعف (363bp) وهي تماثل الوزن الجزيئي لجين *flic* وكانت النتيجة موجبة لـ (19) عينة دم للمرضى من مجموع (71) أي بنسبة (26.76%) والذي شكل فارقاً معنويا عالياً عند مستوى (p0.01) اذ بلغت قيمة مربع كآي (8.177) في حين أظهرت مجموعة السيطرة (25) عينة نتائج سلبية والشكل (2) يوضح نتائج الترحيل الكهربائي لعينات المرضى والسيطرة والذي يظهر حزم (363bp) وهي دليل الإصابة الفعلية للمرضى ووجود البكتريا.

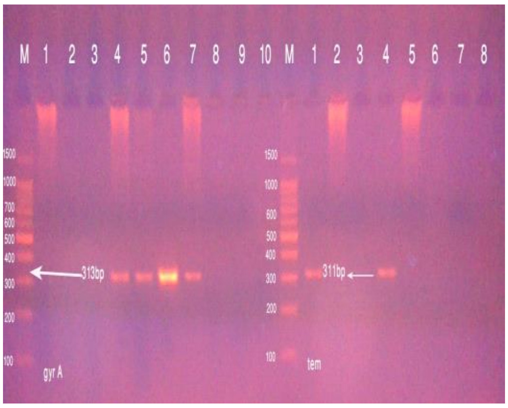


الشكل -(2)الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة ألدنا لجين *flic* في بكتريا *S.typhi*

المسار M الدليل الحجمي (bp DNA ladder100) ، المسار (1) السيطرة الموجبة ، المسارات (2-6) النتيجة السالبة ، المسار (7) السيطرة السالبة .

إن اختبار PCR يمثل الاختبار الأكثر دقة وحساسية في تشخيص الإصابة بالمرضى وخلال جميع مراحله من الاختبارات السريرية المستخدمة في تشخيص الإصابة بمرض التايفوئيد مثل اختبار widal وان تزايد حالات الإصابة بحمى التايفوئيد قاد إلى تركيز الجهود لإيجاد وسيلة لتشخيص هذه البكتريا تتسم بالسرعة والحساسية العالية (14) إذ إن الاعتماد على الطرق التقليدية كاجتياز widal المعتمد حاليا في المستشفيات والمختبرات الحكومية والأهلية يعتمد على التلازن بين المستضدات والأضداد وهذا لا يحصل إلا بعد ظهور أضداد المستضد (0) خلال (6-8) أيام وظهور أضداد المستضد [H] خلال (10-12) يوم (15) وهذا بالتالي يودي إلى تأخر الكشف عن الإصابة ثم استعجال المرض لذا فان تصفية PCR لتطلب ساعات قليلة فقط بعد استخلاص ألدنا للحصول على معلومات (16) تم استخدام العينات (19) التي أعطت نتيجة موجبة في اختبار *flic gene* للتحري عن الجينات المقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا *S.typhi* .

أظهرت النتائج إلى *S.typhi* تحتوي على جين (*tem*) والذي يشفر لمضاد Ampicillin إذ ظهرت حزم (311bp) تطابق وزنها الجزئي لهذا ألجين وقد تشكل هذا ألجين النسبة الأعلى في المقاومة لدى *S.typhi* إذ بلغت (31.03%)من نسب المقاومة ، إذ أشار العديد من الباحثين إلى إن المقاومة لمضاد الامبسيلين قد تكون كروموسومية الموضع وغالبا ما تكون على بلازميدات اقترانية أو على العناصر الوراثية الفاخر(transposons) والذي يزيد فرصة انتشار المقاومة (17) ، وكذلك تم التحري عن جين (*gyrA*) والذي يشفر الى المقاومة لمضاد(Ciprofloxacin) الحيوي في بكتريا *S.typhi* إذ ظهرت النتائج حزم بطول (313bp) بعد إجراء التضخيم دلالة لوجود هذا ألجين وقد شكل نسبة مقاومة بلغت (24.14%) من نسب المقاومة ويعتقد بان احد الأسباب التي أعطت هذا ألجين صفة المقاومة هو ان هناك طفرة كروموسومية لجين (*gyrA*) .....إلى تغير في التعبير الجيني تحدث في الموقع (ser 83 phe) (18) وهذه تودي إلى انخفاض الاستجابة باستمرار للـ Ciprofloxacin وهذا له دور كبير في ظهور مقاومة هذا ألجين (1) وكذلك يعتقد بان صفة المقاومة قد تكون في بلازميد متنقل أو جين قافز ونظراً لكون الأوزان الجزئية لجين (311bp (*tem*) و(*gyr A*) (313bp) فقد تم إجراء عملية التوصيل على هلام الاكاروز ولكلا الجينين في تجربة واحدة وبصورة متقابلة لزيادة الدقة في التميز بينهم والشكل (3) يوضح هذه النتائج

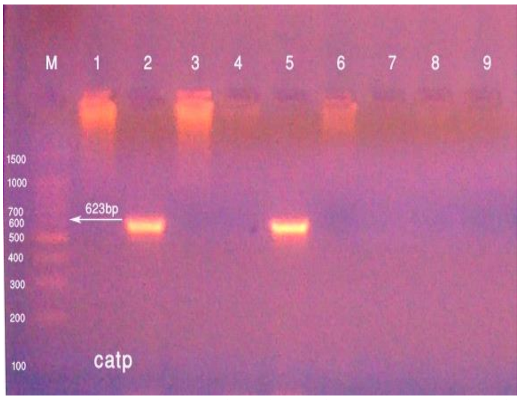


الشكل -3 (A,B) نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لجيني *gyrA* و *tem*

الشكل -3(A) نتائج الكشف لجين *gyrA*: المسار M الدليل ألحجمي (bp DNA ladder100)،المسارات (1-3,8,9) النتيجة السالبة، المسار (4-7) النتيجة الموجبة ، المسار (10) السيطرة السالبة .

الشكل-3 (B) نتائج الكشف لجين *tem* : المسار M الدليل ألحجمي (bp DNA ladder100)،المسارات (7,6,5,3,2) النتيجة السالبة ، المسار (4,1) النتيجة الموجبة ، المسار (8) السيطرة السالبة .

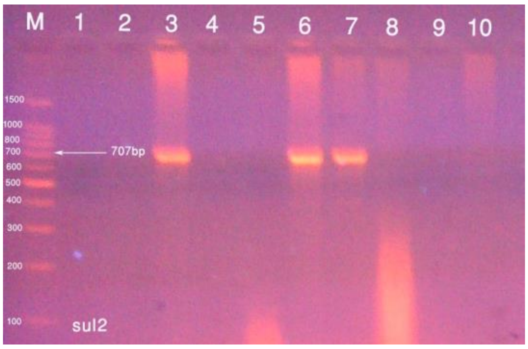
شكل ألجين *catp* الذي يحمل صفة المقاومة لمضاد Chloramphenicol اقل نسبة مقاومة للمضادات الحياتية إذ بلغت (20.69%) إذ ظهرت الحزم والتي تماثلت مع الوزن الجزيئي (623bp) وتعزى مقاومة Chloramphenicol على الأغلب إلى إنتاج إنزيم CAT المشفر من قبل بلازميد اقتراني فضلاً عن فقدان ثقوب الغشاء الخارجي (19) والشكل (4) يوضح الجزم الناتجة من تضخيم ألجين *catp*ويوزن جزيئي (623bp)



الشكل-4 نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لجين *catp*

المسار M الدليل الحجمي (100 bp DNA ladder) ، المسار (1) السيطرة السالبة ، المسارات (5,2) النتيجة الموجبة ، المسارات (3,4,6-9) النتيجة السالبة .

كذلك تم التحري عن ألجين (*sul 2*) وال1ي يشفر إلى المقاومة للـ Co.trimoxa zole إذ ظهرت حزم وزنها الجزئي 707bp ونسبة مقاومه(24.14%) وهو الوزن المتوقع للجين (*sul 2*) وتعود المقاومة إلى هذا ألجين إلى تغير التسلسل الأحماض الأمينة للموقع الفعال لإنزيم DHFR وهو من الإنزيمات المهمة للمسار الايضي لصناعة folic acid (20) الشكل (5)



الشكل 5- نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لجين*sul* 2

المسار M الدليل الحجمي (100 bp DNA ladder) ، المسار (1) السيطرة السالبة ، المسارات (3,6,7) النتيجة الموجبة ، المسارات (2,4,5,8-10) النتيجة السالبة .

نتائج هذه الدراسة أظهرت إن هناك مقاومة متعددة للمضادات الحياتية الأربعة الأنفة الذكر إذ كان مجموع العينات الموجبة للـ *flic gene*(19) وجد إن (18) منها تحمل مقاومة متعددة للمضادات أي بنسبة (94.73%) بينما كانت نسبة التحسس (5.26%) .

إن ظهور واستمرار زيادة تعدد المقاومة للمضادات الحيوية أصبح من الضروري تطوير بعض الطرق الفعالة ليس في تشخيص ضمن التايفوئيد في وقت مبكر بل لغرض الحصول معلومات عن نمط المقاومة للسلالات البكترية التي تعطي معلومات للباحثين في مجال صناعة الأدوية لغرض العلاج المناسب.

أظهرت النتائج تعدد المقاومة للمضادات الحيوية MDR التي تمثلت بالخط الأول من المضادات المستخدم في علاج حمى التايفوئيد وهي Amp.Aotri.Cipro.Chlor وهذه اتفقت مع العديد من الدراسات إن نسبة المقاومة ازدادت للمضادات أعلاه في (53.6%) إلى (63.9%) في عام (1997-2001) وان علاج حالات الإصابة ظهرت وبعد فترة من الزمن مقاومة لهذه المضادات (21) إن ارتباط المقاومة والذي يودي بدورة إلى انتشار عزلات متعددة المقاومة ولعل الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية أو الاستعمال غير المبرر من حيث الجرعة والفترة الزمنية من قبل المرضى له دور في إظهار المقاومة .

إن اختيار PCR كفوء في تحديد الإصابة إذ تبين مما سبق من النتائج إن شخص واحد فقط من مجموع المرضى المعالجين بسبب حمى التايفوئيد فقط هو من سوف يستفاد من العلاج.

المصادر:

1-Yoon, H.J.; Cho,S.H. & Kim, S.H. (2009).A Case of Multidrug-Resistant *Salmonella enteric* Serovar Typhi Treated with a Bench to Bedside Approach.

2-Pegues, D.A.; Ohl,M.E. & Miller, S.I. (2005). *Salmonella* Species including *Salmonella typhi*.In: Mondell, douglas and Bennett's principles and practice of infectious Dieseases, 6th ed. Mandell,G.L.;Bennett,J. E.and Dolin, R. (editors).Churchill Livingstone.

3-Bhutta,Z.A.(2006).Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever.BMJ;333:78-82.

4-Karami,A.;Ranjbar,R.;Ahmadi,Z.& Safiri, Z.(2007).Rapid Detection of different serovares of *Salmonella* enteric by multiplex PCR. Iranian. J.Publ Health, 36(2):38-42.

5-Willke,A.W؛.Ergun,H & .Bayar, B.B.(2001). Evaluation of Gruber

Characterization of Shiga Toxin-Producing *E coli* from meat and dairy products. Food Microbiol.398-19.389 .

15-Ismail,T.F.(2006).Rapid diagnosis of typhoid fever. Indian.T. Med.Res 123.:489-492.

16-Woodford,N.& Johnson, A.P. (1998).Molecular bacterialogy.protocol and clinical lications(ed).Central Public Health Laboratory. London. U.K.pp.640-642.

17-Arthur,K؛.Turner;Nair,S &.Wain, J.(2006).The acquisition of full flouroquinolone resistance in *Salmonella* Typhi by accumulation of point mutation in the topoisomerase targets.Oxford Jornal Medicine Jornal of Antimicrobial Chemotherapy. 58(4):733-740.

18-Gallardo, F.; Ruiz,J.; Marco,F.; Towner, K.,J.& Vila,J. (1999). Increase in Incedence of resistance to Ampicillin, Chloramphenicol and Trimethoprium in Clinical Isolates of Salmonella Serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology of Mechanisms of Resistance. J.Med.Microbiol.48:367-374.

19-Grunberg,E.(1973).The effect of Trimethoprim on the Activity of Sulfonamides and Antibiotics in experimental infection. J.Infect. Dis. 128:S478-485.

20-Pokharel,B.M؛. Koirala,J.; Dahal, R.K.; Mishra, S.K.; Khada,P.K &. Tuladhar, N.R. (2006).Multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase(ESBL)-Producing *Salmonella* enteric(serotypes typhi and paratyphiA)from blood isolates . in Nepal:surveillance of resistance and a search for newer alternative.Int.J.Infect Dis.8-10:434:

21-Chen,C؛.Eckmann،L.;Libby,S &. Fang,F.(1999).Expression of *Salmonella typhimurium rpos* and *rpos* –dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. Infect. Immun.743-64:739.

Widal test in diagnosis of typhoid fever. Clin. Microb & Infect.394-7:1. 6Internet.(2007)

7-Zhou,L.& Pollard,A.J.(2010).AFast and Highly sensitive Blood culture PCR method for Clinical Detection of *Salmonella enteric* serovar *Typhi.* Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.9(1):1 4.

8-Sambrook,K.J.; Fritsch, E. and Maniatis, T.(1989).Molecular cloning and laboratory manual 2nd ed.Cold spring Harbour laboratories,NewYork.

9Haque,A.;AbdulHaque;Sarwar,S.;Ali, A.;Bashir,S.;Tariq,A.&Mohsin,M.(200 5).Identification of drug resistance gene in clinical isolates of *Salmonella typhi* for development of diagnostic multiplex PCR. Pak.J. med. Sci. 21(4):402-407.

10-Song, J.H.;Cho, H.;Park, M.Y.; Na,D. S.;Moon,H.B.; Pai,C.H. (1993). Detection of *Salmonella typhi* in the blood of Patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol.31,1439-1443.

11-Chiu,C.H؛.Tsu-Lan,W.;Lin-Hui, S.; Chishih, C.;An-Jibg, K.; Maw sheng, C &. Tzou-Yien, L. (2002). The emergence in Taiwan of fluoroquinolon resistance in *Salmonella enteric* serotype Choleraesuis. N Engl.J.Med-346:413. .9

12-Chu,C.; Cheng-Hsun, C.;Wan-Yu,W.; Chi-Chong, C.;Tsui-Ping,L. & Jonathen,T. (2001). Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enteric* serovar Choleraesuis. Antimicrob Agent Chemo.45:2299-303.

13-Beatriz,G.;Soto,S.M.;Arguelles, J. M. & Mendoza,M.C.(2001).Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying aclass 1 Integron in the emergent *Salmonella enteric* serotypem Antimicrobial Agents Chemotherapy.45:1305-98.

14-Al-Galas,N؛.Ben Aissa, R.; Attia, Th &.Bahri,O .(2002).Isolation and

Using the molecular methods in detection of antibiotics resistance genes in bacteria of Typhoi (*Salmonella typhi)*

Batool A. Shihab*   Sahira Y. Rwayah*   Ashna J. Faik**

*University of Baghdad, College of Science for Women, Department of Biology.
**Center Public Health Laboratory/ Ministry of Health.

Abstract:

This study was carried out for direct detection of typhi and some of its multidrug resistance genes(*tem,capt,gyrA&sul2*)which encode for resistance to (Ampicillin, Chloramphenicol,Ciprofioxacin,Co-trimoxazole)by using Polymerase Chain Reaction technique .(71)blood samples for people suffering from typhoid fever symptoms depending on the clinical examination and (25)for control were collected.

The results investigation for *flic* gene which encode for flagellin protein indicated that only (19)with percentage of (26,76%)gave appositive results while all control had a negative ones.

Investigation for antibiotic resistance drug in samples which show positive results for *flic gene* showed that there is a multidrug for all antibiotics with (94.73%) in patients